

(12)

(21) **2 414 289**

(22) **29.06.2001**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **G01N 21/35, G01N 21/25,  
G01N 21/64, G01N 21/65**

(85) **23.12.2002**

(86) **PCT/FR01/02101**

(87) **WO02/001199**

(30) **00/08440 FR 29.06.2000**

(71) **BIOALLIANCE PHARMA (S.A.),  
59, Boulevard du General Martial  
F-75015, PARIS, XX (FR).**

(72) **MANFAIT, MICHEL (FR).  
SOCKALINGUM, DHIRUVANANDA (FR).**

(74) **GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP**

(54) **METHODE D'IDENTIFICATION D'UNE CARACTERISTIQUE BIOLOGIQUE FONCTIONNELLE D'UNE  
MATIERE VIVANTE**

(54) **METHOD FOR IDENTIFYING A FUNCTIONAL BIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF A LIVING MATTER**

(57)

La présente invention concerne une méthode d'identification d'une caractéristique biologique fonctionnelle d'une matière vivante comprenant les étapes suivantes: (a) on soumet au moins une matière biologique de référence pour une caractéristique biologique fonctionnelle à une analyse physique APr pour établir son spectre SAPr, (b) on calcule les facteurs discriminants CPnr par une analyse statistique de tout ou partie du spectre SAP obtenu à l'étape (a), (c) on établit à partir desdits facteurs discriminants CPnr un descripteur fonctionnel spécifique Dfs de la caractéristique biologique fonctionnelle, (d) on soumet la matière vivante à analyser aux étapes (a) et (b), (e) on compare les facteurs discriminants CP de la matière vivante à analyser avec le descripteur fonctionnel spécifique Dfs obtenu à l'étape (c) afin de déduire une caractéristique biologique fonctionnelle éventuelle de la matière vivante à analyser.



Office de la Propriété  
Intellectuelle  
du Canada

Un organisme  
d'Industrie Canada

Canadian  
Intellectual Property  
Office

An agency of  
Industry Canada

CA 2414289 A1 2002/01/03

(21) **2 414 289**

(12) **DEMANDE DE BREVET CANADIEN  
CANADIAN PATENT APPLICATION**

(13) **A1**

(86) **Date de dépôt PCT/PCT Filing Date:** 2001/06/29  
(87) **Date publication PCT/PCT Publication Date:** 2002/01/03  
(85) **Entrée phase nationale/National Entry:** 2002/12/23  
(86) **N° demande PCT/PCT Application No.:** FR 2001/002101  
(87) **N° publication PCT/PCT Publication No.:** 2002/001199  
(30) **Priorité/Priority:** 2000/06/29 (00/08440) FR

(51) **Cl.Int.<sup>7</sup>/Int.Cl.<sup>7</sup>** G01N 21/35  
(71) **Demandeur/Applicant:**  
BIOALLIANCE PHARMA (S.A.), FR  
(72) **Inventeurs/Inventors:**  
MANFAIT, MICHEL, FR;  
SOCKALINGUM, DHIRUVANANDA, FR  
(74) **Agent:** GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP

(54) **Titre : METHODE D'IDENTIFICATION D'UNE CARACTERISTIQUE BIOLOGIQUE FONCTIONNELLE D'UNE  
MATIERE VIVANTE**

(54) **Title: METHOD FOR IDENTIFYING A FUNCTIONAL BIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF A LIVING MATTER**

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne une méthode d'identification d'une caractéristique biologique fonctionnelle d'une matière vivante comprenant les étapes suivantes: (a) on soumet au moins une matière biologique de référence pour une caractéristique biologique fonctionnelle à une analyse physique AP<sub>r</sub> pour établir son spectre SAP<sub>r</sub>, (b) on calcule les facteurs discriminants CP<sub>n</sub>r par une analyse statistique de tout ou partie du spectre SAP obtenu à l'étape (a), (c) on établit à partir desdits facteurs discriminants CP<sub>n</sub>r un descripteur fonctionnel spécifique D<sub>f</sub>s de la caractéristique biologique fonctionnelle, (d) on soumet la matière vivante à analyser aux étapes (a) et (b), (e) on compare les facteurs discriminants CP de la matière vivante à analyser avec le descripteur fonctionnel spécifique D<sub>f</sub>s obtenu à l'étape (c) afin de déduire une caractéristique biologique fonctionnelle éventuelle de la matière vivante à analyser.

Canada

<http://opic.gc.ca> • Ottawa-Hull K1A 0C9 • <http://cipo.gc.ca>

OPIC • CIPQ 191

OPIC



CIPO

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
3 janvier 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/01199 A1(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

G01N 21/35

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/02101

(22) Date de dépôt international : 29 juin 2001 (29.06.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/08440

29 juin 2000 (29.06.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : BIOAL-  
LIANCE PHARMA (S.A.) [FR/FR]; 59, Boulevard du  
Général Martial Valin, F-75015 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MANFAIT,  
Michel [FR/FR]; 8, Impasse de Louvois, F-51380 Verzy  
(FR). MORJANI, Hamid [FR/FR]; 21, rue Montoisson,  
F-51100 Reims (FR). SOCKALINGUM, Dhruvananda  
[FR/FR]; 7, rue Fenelon, F-51100 Reims (FR).(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz,  
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale  
avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçuesEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING A FUNCTIONAL BIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF A LIVING MATTER

(54) Titre : METHODE D'IDENTIFICATION D'UNE CARACTERISTIQUE BIOLOGIQUE FONCTIONNELLE D'UNE MA-  
TIERE VIVANTE

(57) Abstract: The invention concerns a method for identifying a functional biological characteristic of a living matter comprising the following steps: (a) subjecting at least a reference biological matter for a functional biological characteristic to an analysis to establish its spectrum; (b) calculating the discriminating factors by a statistical analysis of all or part of the spectrum resulting from step (a); (c) establishing from said discriminating factors a specific functional descriptor of the possible functional biological characteristic of the living matter to be analysed with the specific functional descriptor obtained at step (c) so as to deduce a possible functional biological characteristic of the living matter to be analysed.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode d'identification d'une caractéristique biologique fonctionnelle d'une matière vivante comprenant les étapes suivantes: (a) on soumet au moins une matière biologique de référence pour une caractéristique biologique fonctionnelle à une analyse physique APr pour établir son spectre SAPr, (b) on calcule les facteurs discriminants CPnr par une analyse statistique de tout ou partie du spectre SAP obtenu à l'étape (a), (c) on établit à partir desdits facteurs discriminants CPnr un descripteur fonctionnel spécifique Dfs de la caractéristique biologique fonctionnelle, (d) on soumet la matière vivante à analyser aux étapes (a) et (b), (e) on compare les facteurs discriminants CP de la matière vivante à analyser avec le descripteur fonctionnel spécifique Dfs obtenu à l'étape (c) afin de déduire une caractéristique biologique fonctionnelle éventuelle de la matière vivante à analyser.



WO 02/01199 A1

METHODE D'IDENTIFICATION D'UNE CARACTERISTIQUE  
BIOLOGIQUE FONCTIONNELLE D'UNE MATIERE VIVANTE.

L'invention se rapporte à une méthode pour  
5 étudier l'aspect multifactoriel d'une fonction biologique  
faisant intervenir à la fois des technologies physiques  
associées à des méthodes biologiques prenant plus d'un  
critère biologique en compte. L'invention permet  
d'identifier des caractéristiques fonctionnelles de  
10 cellules vivantes, de tissus ou de microorganismes.

La méthode de l'invention trouve de nombreuses  
applications comme l'analyse de phénomènes de résistance  
(oncologie et infectiologie), l'identification des tissus  
et cellules (histocytologie, classification, tumeurs  
15 primitives ou métastatiques), l'identification et l'analyse  
de microorganismes (Identification, Sensibilité/Résistance,  
Virulence, Epidémiologie).

L'évaluation d'une fonction particulière d'une  
20 cellule ou d'un tissu repose à l'heure actuelle sur un  
descriptif biologique. Il est établi sur des bases  
morphologiques ou bien sur la mise en évidence de marqueurs  
biochimiques, la vérification de l'expression de gènes, la  
vérification de l'expression phénotypique, la vérification  
25 *in vitro* de la fonction ou de la croissance d'une cellule  
en présence de drogues ou de marqueurs spécifiques.  
Plusieurs recherches et examens successifs sont nécessaires  
si tous ces critères sont pris en compte.

Ainsi dans le domaine de la résistance à la  
30 chimiothérapie, de nombreux marqueurs sont décrits dans la

littérature (Robert J., Multidrug resistance in oncology : diagnostic and therapeutic approaches, Europ J of Clin Investig (1999), 29, 536-545). La mesure est réalisée par des techniques biologiques de mesures immunohistochimiques des protéines reliées aux phénomènes de multirésistance (P-gp, MRP, LRP). La mesure de la fonctionnalité de ces pompes (cytométrie de flux) est également proposée. Enfin la mesure de l'expression du gène de résistance (RT-PCR, cytométrie de flux) est réalisée (Marie J. P et al, Multicentric evaluation of the MDR phenotype in leukemia, Leukemia 1997, 11 : 1095-1106).

Ainsi, le National Cancer Institute utilise la fonction d'expulsion des protéines exprimées en cas de résistance et mesure ainsi l'efflux de rhodamine par la pompe P-gp sur 60 lignées de cultures cellulaires, ceci est réalisé dans un programme appelé COMPARE program (Alvarez M. et al., Generation of a drug resistance profile by quantification of mdrl/ P-gp in the cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen, J of Clinical Invest 1995, 95 : 2205-2214). Ce programme a cependant ses limites car le mécanisme de résistance induit, analysé par ce critère, est fréquent mais rarement seul en cause en clinique.

D'autres marqueurs de résistance sont établis en mesurant l'accumulation intracellulaire de substances endogènes ou à visée thérapeutique en (glutathion, adduits de DNA, médicaments). Ces marqueurs dépendent du mécanisme de résistance et des médicaments inducteurs (Morjani H. et al., Anthracycline subcellular distribution in human leukemic cells by microspectrofluorometry : factors

contributing to drug-induced cell death and reversal of multidrug resistance, Leukemia 1997, 11 :1170-1179).

Sur le plan des méthodes biologiques, il existe depuis longtemps des méthodes d'évaluation de la  
5 susceptibilité/résistance à une chimiothérapie. Elles reposent sur le concept de « chimiogrammes » dérivé du concept des antibiogrammes avec une prédiction de la sensibilité à des drogues (Human Tumor Stem Cell Assay) pour apprécier, en culture, la croissance en présence de  
10 classes chimiques variées et définir ainsi la susceptibilité ou la résistance (Legrand o. et al., Simultaneous activity of MRP1 and P-gp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia, Blood 1999,  
15 94 : 1046-1056).

Ces méthodes ont des limites et sont peu utilisées en clinique. Ceci est dû au prélèvement des cellules et à leur mise en culture. En effet, toutes les cellules ne prolifèrent pas, il est difficile d'obtenir une  
20 culture en agar, représentative de la prolifération cellulaire (35 % à 60% sont évaluables) (Von Hoff DD., He's not going to talk about in vitro predictive assays again, is he ?, J. Nat Cancer Inst 1990, 82 : 96-101).

Il ressort que parmi toutes les méthodes  
25 biologiques de plus en plus perfectionnées proposées aucune ne recueille l'unanimité car elles sont limitées par le critère choisi, rarement représentatif du caractère multifactoriel d'un état ou d'une fonction cellulaire. La mise en jeu du recueil de données nécessitant plusieurs  
30 méthodes se voit limitée par la multiplicité successive des

techniques (génétiques, chimiques immunologiques, analytiques, culture) à mettre en œuvre.

Par ailleurs, une évaluation par des méthodes physiques a déjà été décrite dans la demande de brevet européen publiée sous le No. 0 568 126 en utilisant une technique de microscopie laser confocale pour déterminer la résistance ou la sensibilité à la doxorubicine de cellules en culture. Dans cette demande de brevet, seule une image de fluorescence différente est observée dans la membrane de cellules K562 résistantes. Cette image reflète simplement les altérations membranaires dues à l'accumulation de doxorubicine fluorescente dans les pompes P-gp, sur exprimées en cas de résistance, est représentée une simple alternative aux méthodes immunohistochimiques développées plus haut.

Les limites de cette méthode d'imagerie sont, notamment, liées aux inconvénients d'étudier la localisation de la pompe P-gp dans la membrane sur une seule image. Cette localisation membranaire ne reflète aucunement sa fonction et il n'est pas discriminant d'un état de résistance qui, sur le plan biologique, est multifactoriel chez l'homme.

Ainsi, la méthode décrite dans cette demande de brevet ne permet pas de distinguer, par exemple, un phénotype P-gp d'un phénotype MRP1.

La microscopie confocale à fluorescence a également ses limites car l'information obtenue est souvent mono-paramétrique voire bi-paramétrique (mesure à une ou deux longueurs d'onde dans le spectre d'émission de fluorescence).

Dans le domaine de la microbiologie, il a été décrit dans le brevet US No. 5 660 998 l'utilisation d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier pour identifier des microorganismes. L'identification repose sur la comparaison globale d'un sel spectre IR du microorganisme considéré avec une banque pré-établie de spectres. Bien que ce seul spectre puisse conduire à l'identification, il ne permet pas dans sa globalité de définir une fonction ou un caractère biologique associé au microorganisme (par exemple, la sensibilité ou la résistance à une famille d'antibiotiques.

La méthode de l'invention vise précisément à éviter les inconvénients des méthodes de l'art antérieur décrites ci-dessus en offrant la possibilité de recueillir simultanément plusieurs critères pertinents associés à la fonction biologique étudiée. Grâce à une modélisation mathématique (analyse statistique multivariée, réseaux de neurones, algorithmes génétiques, etc), la méthode de l'invention permet d'identifier les caractéristiques fonctionnelles de cellules vivantes ou de tissus prenant en compte l'aspect multifactoriel d'une fonction et donc en intégrant simultanément plusieurs critères biologiques.

Ce but est atteint selon l'invention grâce à une méthode d'identification d'une caractéristique fonctionnelle d'une matière biologique comprenant les étapes suivantes :



a) on soumet au moins une matière biologique de référence pour une caractéristique fonctionnelle à une analyse physique (Apr) pour établir son spectre (SAPr),

5 b) on calcule les facteurs discriminants (CPnr) par une analyse statistique de tout ou partie du spectre SAP obtenu à l'étape (a),

c) on établit à partir desdits facteurs discriminants (CPnr) un descripteur fonctionnel spécifique (Dfs) de la caractéristique fonctionnelle,

10 d) on soumet la matière biologique à analyser aux étapes (a) et (b),

e) on compare les facteurs discriminants (CP) de la matière biologique à analyser avec le descripteur fonctionnel spécifique (Dfs) obtenu à l'étape (c) afin de  
15 déduire une caractéristique fonctionnelle éventuelle de la matière biologique à analyser.

Avantageusement, l'étape (a) comprend l'analyse de plusieurs matières biologiques de référence présentant  
20 ou non la caractéristique fonctionnelle.

La méthode de l'invention est remarquable en ce qu'elle met en oeuvre un modèle intégré basé sur la construction du descripteur fonctionnel spécifique Dfs de l'état biologique. Par exemple, en ce qui concerne la  
25 résistance, plusieurs facteurs peuvent être analysés simultanément. Ainsi, le descripteur intégré de l'état biologique sera construit pour être représentatif de la fonction *in vivo* et augmenter la prédictivité de la réponse. Il prendra en compte dans une même analyse  
30 l'aspect multifactoriel existant en clinique humaine.

Cette technique de descripteur permet notamment d'intégrer rapidement un nouveau critère utile en clinique.

Ainsi, la méthode de l'invention permet sur des cellules, des microorganismes ou des tissus vivants de déterminer, à partir de plusieurs critères moléculaires recueillis grâce à l'analyse physique (Apr), une ou plusieurs caractéristiques biologiques fonctionnelles et de définir ainsi un descripteur fonctionnel spécifique (Dfs) de celle(s)-ci.

La matière biologique analysée par la méthode de l'invention peut être un échantillon cellulaire ou tissulaire ou même une unique cellule. Il peut s'agir par exemple de cellules tumorales provenant soit de cultures soit de patients après prélèvement sanguin ou par biopsie tissulaire et par la suite isolées sur gradient de densité.

Dans le cas des tissus, les analyses physiques peuvent être réalisées soit sur des pièces anatomiques extemporanées soit *in vivo* (directement sur les tissus accessibles ou à la suite d'un acte chirurgical ou par voie endoscopique).

La matière biologique analysée par la méthode de l'invention peut être aussi un microorganisme (bactéries, levures, champignons, etc) obtenu à partir par exemple d'un foyer infectieux ou lors d'une mise en culture (après ensemencement sur gélose) permettant également l'analyse de microcolonies.

Ces échantillons sont maintenus dans des conditions de survie pendant les analyses physiques (AP).

La méthode de l'invention présentent l'avantage, par rapport aux techniques d'analyse de l'art antérieur, de ne nécessiter aucun marquage préalable des échantillons pour les analyses physiques (AP).

5

L'analyse physique de matière(s) biologique(s) de référence (APr) et de la matière biologique à analyser (AP) de l'étape (a) est avantageusement réalisée par spectroscopie et microspectroscopie optique et plus particulièrement avec les spectroscopies vibrationnelles Raman et infrarouge et d'émission de fluorescence, ou une combinaison de ceux-ci, permettant d'obtenir des spectres (SAPr ou SAP), contenant des informations moléculaires.

10

15

Les spectres Raman son obtenus avec des radiations excitatrices lasers dans le domaine de longueur d'onde allant de l'ultraviolet au proche infrarouge et plus particulièrement à 364, 514, 633, 785 et 830 nm. Le domaine spectral étudié s'étend de 200 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

20

Les spectres de fluorescence sont également obtenus avec des radiations excitatrices lasers dans le domaine de longueur d'onde allant de l'ultraviolet au proche infrarouge (dans le cas d'une excitation multiphotonique) et plus particulièrement à 364, 514, 633 et 785 nm. Le domaine spectral étudié couvre une région de

25

Pour les microspectroscopies Raman et de fluorescence, le choix du grandissement de l'objectif de microscope (par exemple 100X) permet de définir la résolution spatiale (0,5  $\mu\text{m}$ ) au niveau de l'échantillon cellulaire ou tissulaire dont les dimensions varient de 10

30

µm à quelques mm (par exemple : 15 à 30 µm pour les cellules, 40 à 100 µm pour les micro colonies bactériennes, 100 à 2000 µm pour les tissus).

Pour la spectroscopie d'absorption infrarouge par transmission ou par réflexion le domaine spectral analysé s'étend de 400 à 7000  $\text{cm}^{-1}$  (plus particulièrement de 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

En microspectroscopie infrarouge, les spectres sont obtenus avec un objectif de grandissement allant de 8X à 60X (de façon usuelle de 36X) sur des échantillons allant de 10 µm à quelques mm (par exemple : 15 à 30 µm pour les cellules, 40 à 100 µm pour les micro colonies bactériennes, 100 à 2000 µm pour les tissus).

Pour les spectroscopies de diffusion Raman, d'absorption infrarouge et d'émission de fluorescence, les temps d'acquisition des spectres sont compris entre 0,1 et 1000 secondes et plus particulièrement de 1 à 100 secondes pour les mesures associées à la construction du Dfs.

Les spectres des matières biologiques de référence et de la matière biologique à analyser des cellules ou des microorganismes de référence, présentant ou non la caractéristique fonctionnelle recherchée, sont enregistrés dans les mêmes conditions, par les mêmes techniques. Comparée aux données obtenus avec les méthodologies conventionnelles par exemple de biochimie, de biologie cellulaire et moléculaire, de cytométrie en flux et d'immunocytochimie, nécessitant en moyenne de  $10^5$  à  $10^7$  cellules et des temps d'analyse de quelques dizaines de minutes à plusieurs jours, l'obtention des données

spectroscopiques se fait sur un panel de 10 à 100 cellules isolées (plus particulièrement 30) ou à partir de 1000 pour les micro-organismes avec des temps d'analyse de quelques secondes à plusieurs minutes (de façon courante de 1 à 100 secondes).

De façon remarquable, la méthode de l'invention permet d'associer plusieurs critères pour effectuer une analyse de la caractéristique fonctionnelle de la matière biologique :

- Par exemple, pour définir le caractère de sensibilité ou de résistance, il est possible d'identifier un premier critère spectroscopique à partir de cellules connues pour être sensibles ou résistantes et l'associer à un deuxième critère spectroscopique spécifique d'un état de résistance vis à vis d'une substance particulière (par exemple doxorubicine). Ceci permettant la construction d'un descripteur fonctionnel spécifique (Dfs) d'un phénotype de résistance spécifique à l'agent anticancéreux (par exemple Pgp-DOX).

- Lors d'un prélèvement, il est possible non seulement de réaliser l'identification cellulaire ou tissulaire (origine tissulaire de la cellule : sein, sang, prostate, vessie) mais aussi identifier une fonction ou un état associé à ces cellules (par exemple : pouvoir métastasiant ou non).

- En ce qui concerne les microorganismes, leur nature, leur identification et tout autre caractère particulier pourront être enregistrés et couplés à d'autres critères (résistance/sensibilité, virulence ou non).

Les spectres recueillis à l'étape (a) font ensuite l'objet d'analyses statistiques multivariées en Analyse en Composantes Principales (ACP) ou bien en PLS (Partial Least Square) ou par d'autres méthodes mathématiques appropriées, comme par exemple une représentation euclidienne, une méthode KNN, une méthode SIMCA, ou encore une combinaison de celles-ci, pour identifier les facteurs discriminants. La méthode PLS est une méthode de régression linéaire applicable lorsque les variables prédictives sont colinéaires (Haaland D. et Thomas E., Partial Least Squares methods for spectral analysis, Anal Chem (1988), 60, 1193). La méthode KNN est une méthode statistique multivariée basée sur l'Analyse en Composantes Principales et qui consiste à classer des échantillons inconnus en fonction de leur proximité dans l'espace multidimensionnel avec des échantillons connus (Adam J., 1995, Chemometrics in Analytical Spectroscopy, Cambridge, The Royal Society of Chemists). La méthode SIMCA (Soft Independent Modelling by Class Analogy) est une méthode statistique multivariée basée sur l'Analyse en Composantes Principales et qui nécessite la construction de modèles d'Analyse en Composantes Principales décrivant chacune des classes de référence (Frank, I. et Lanteri, S., 1989, Chemometrics and Intelligent Laboratory systems, 5, 247). Cette représentation va permettre d'identifier et d'attribuer les éléments spectroscopiques discriminants aux différents critères biologiques étudiés. En pratique, un ensemble d'intervalles de fréquence est retenu pour son profil de discrimination adapté au caractère fonctionnel

étudié. Ainsi, l'ensemble des éléments spectraux les plus discriminants permet la construction du descripteur fonctionnel spécifique de la caractéristique fonctionnelle biologique étudiée prenant en compte plusieurs phénomènes ou critères biologiques fonctionnels.

A l'étape (d), la matière biologique à analyser va suivre exactement la même procédure des étape (a) à (b) que celle du ou des matières biologique(s) de référence pour être ensuite comparé lors de l'étape (e) au descripteur fonctionnel obtenu à l'étape (c). Avantageusement cette comparaison consiste à mesurer la distance entre les CPn de la ou des matières biologiques de référence de référence et les CP de la matière biologique à analyser.

La matière biologique à analyser est ainsi projetée dans le plan factoriel retenu pour la présentation des résultats et sera ainsi classé suivant la caractéristique fonctionnelle étudiée.

Par exemple, dans le cas d'une caractérisation d'un phénotype de résistance à partir de données spectroscopique, un ensemble de spectres (Raman, infrarouge, fluorescence) sont enregistrés sur des cellules tumorales isolées (en culture ou isolées de patients). Ces données permettent, à l'aide de méthodes statistiques appropriées, d'extraire un sous-ensemble d'éléments spectroscopiques (par exemple intensité, fréquence, polarisation, durée de vie). De façon remarquable, la combinaison de ces éléments permet de construire un Dfs conduisant à une discrimination de deux ou plusieurs

populations cellulaires (par exemple sensibles ou résistante) ou des sous-populations possédant une fonction biologique particulière (par exemple un mécanisme de résistance spécifique tel que Pgp, MRP1, non-MDR, etc).

5

L'étude statistique des différences spectrales se fait donc entre le système exprimant ou non les différents critères biologiques utiles à la détermination de la fonction. Par exemple pour la problématique du phénotype de résistance dans la pathologie du cancer, il est possible d'intégrer :

10

- l'origine de la cellule cancéreuse (sein, leucémie, vessie, prostate, etc),

15

- le caractère de sensibilité ou de résistance (cultures connues pour être sensibles ou résistantes),

20

- le type de substance ayant induit la résistance : par exemple, classe des anthracyclines, des vincaalcaloïdes, des taxanes, des platines, ces classes étant connues pour mettre en jeu plusieurs de types de pompes ou de phénomènes intervenant dans la fonction de résistance.

Mais l'invention trouve aussi des applications en matière d'identification d'autres fonctions ou états biologiques sur :

25

- des cellules eucaryotes, comme par exemple, l'état de différenciation, les phases du cycle cellulaire, les voies de signalisation, l'apoptose et nécrose, l'aptitude à la prolifération, le pouvoir invasif, l'état tumoral, etc,



- des microorganismes, comme par exemple, la sensibilité à une famille ou des familles d'antibiotiques, la virulence, l'adhésion et les mécanismes d'infection, etc,

5                   - des tissus, sains, pathologiques, tumoraux, pré-tumoraux, présentant une aptitude à la régénération, un état d'oxygénation, etc.

Ainsi, on envisage plus particulièrement les applications suivantes de la méthode de l'invention :

10                   - sensibilité/résistance notamment vis à vis de différentes classes d'agents pharmacologiques,

- identification des tissus et cellules (organe d'origine, histologie, tumeurs primitives ou métastatiques),

15                   - guidage de l'acte chirurgical dans le cas de la résection d'une tumeur,

- identification des microorganismes (identification du genre, de l'espèce et de la souche, résistance, virulence),

20                   - identification de nouvelles cibles antibactériennes,

- thérapie cellulaire : caractérisation d'une fonction cellulaire de cellules dendritiques ,

25                   - prédiction d'une réponse thérapeutique, création d'un Def permettant de définir les bons et les non- répondeurs à une chimiothérapie (pharmacologie prédictive et diagnostic précoce),

- suivi de la réponse thérapeutique individuelle pour un nouveau patient ou lors d'une rechute.

30                   - gradation de la pathologie.

- identification de facteurs pronostics orientant les choix thérapeutiques (de nouveaux facteurs évolutifs pouvant être intégrés).

5 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront de la description ci-après des figures en annexe concernant l'utilisation des spectroscopies pour définir un descripteur fonctionnel associé à une caractéristique biologique consistant en la  
10 résistance multiple aux agents anticancéreux dans différentes lignées cellulaires.

La figure 1 représente les spectres RAMAN de cellules leucémiques humaines K562 sensibles (S) et résistantes (R) avec un phénotype MDR.

15 Les spectres de la figure 1 sont soumis à une Analyse en Composantes Principales (ACP). La figure 2 montre un exemple de composantes principales, qui après analyse discriminante pour une fonction biologique, serviront à la définition de Dfs et à la représentation 2D  
20 (plan factoriel). La figure 2 donne un exemple de 3 composantes principales pour la construction du descripteur fonctionnel spécifique du phénotype de résistance par analyse discriminante des composantes CP1, CP2, CP3, ..., Cpn.

25 Les figures 3, 4 et 5 représentent une projection 2D ou 3D (plan factoriel) de la classification de la caractéristique fonctionnelle à identifier sur la base de sa contribution dans les données spectrales initiales.

La figure 3 représente l'identification dans un  
30 plan factoriel 2D (CP1 versus CP3) des cellules K562, HL60

et J82 sensibles et K562 résistantes (chaque système est individualisé).

La figure 4 représente le regroupement d'une nouvelle lignée HL60 résistante avec le cluster K562 R. Ces  
5 lignées bien que différentes sont regroupées sur le caractère "résistance multiple". Ceci montre la possibilité de caractériser une fonction biologique précise dans différents systèmes cellulaires.

La figure 5 représente Une nouvelle lignée  
10 résistante J82 R, qui ne présente pas le même mécanisme de résistance que les K562 R et HL60 R, n'est pas regroupée dans le même cluster.

## REVENDECATIONS

1) Méthode d'identification d'une caractéristique biologique fonctionnelle d'une matière vivante comprenant les étapes suivantes :

a) on soumet au moins une matière biologique de référence pour une caractéristique biologique fonctionnelle à une analyse physique APr pour établir son spectre SAPr,

b) on calcule les facteurs discriminants CPnr par une analyse statistique de tout ou partie du spectre SAP obtenu à l'étape (a),

c) on établit à partir desdits facteurs discriminants CPnr un descripteur fonctionnel spécifique Dfs de la caractéristique biologique fonctionnelle,

d) on soumet la matière vivante à analyser aux étapes (a) et (b),

e) on compare les facteurs discriminants CP de la matière vivante à analyser avec le descripteur fonctionnel spécifique Dfs obtenu à l'étape (c) afin de déduire une caractéristique biologique fonctionnelle éventuelle de la matière vivante à analyser.

2) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la matière vivante substantiellement pure est un échantillon cellulaire ou tissulaire ou une unique cellule.

3) Méthode selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que les mesures physiques sont réalisées par spectroscopie ou microspectroscopie, et plus

particulièrement par spectroscopies vibrationnelles Raman, infrarouge, ou d'émission de fluorescence, ou une combinaison de celles-ci.

5                   4) Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que les mesures de spectroscopies vibrationnelles Raman ou d'émission de fluorescence sont effectuées avec des radiations excitatrices lasers dans le domaine de longueur d'onde allant de l'ultraviolet au  
10                   proche infrarouge et plus particulièrement à 364, 514, 633 et 785 nm, et dans un domaine spectral s'étendant de 200 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

15                   5) Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que les mesures de spectroscopies d'absorption infrarouge par transmission ou par réflexion sont effectuées dans un domaine spectral s'étendant de 400 à 7000  $\text{cm}^{-1}$ , plus particulièrement de 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

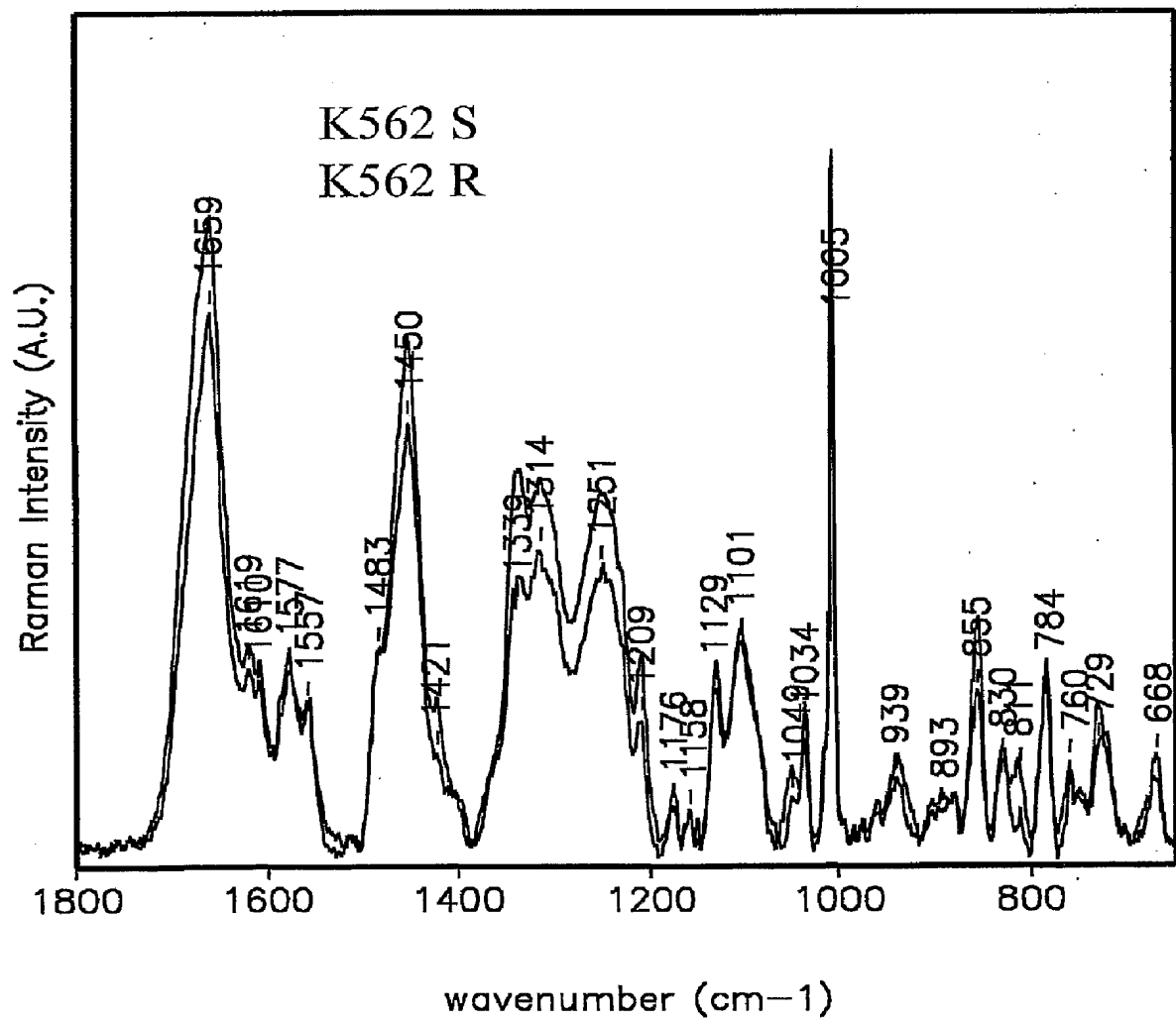
20                   6) Méthode selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisée en ce que les temps d'acquisition des spectres des mesures de spectroscopies de diffusion Raman, d'absorption infrarouge et d'émission de fluorescence, sont compris entre 0,1 et 1000 secondes et  
25                   plus particulièrement de 1 à 100 secondes pour les mesures associées à la construction du descripteur fonctionnel intégré.

30                   7) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'analyse

statistique pour caractériser les facteurs discriminants est une Analyse en Composante Principale (ACP) ou bien en PLS (Partial Least Square) ou encore une représentation euclidienne, une méthode KNN, une méthode SIMCA, ou une  
5 combinaison de celles-ci.

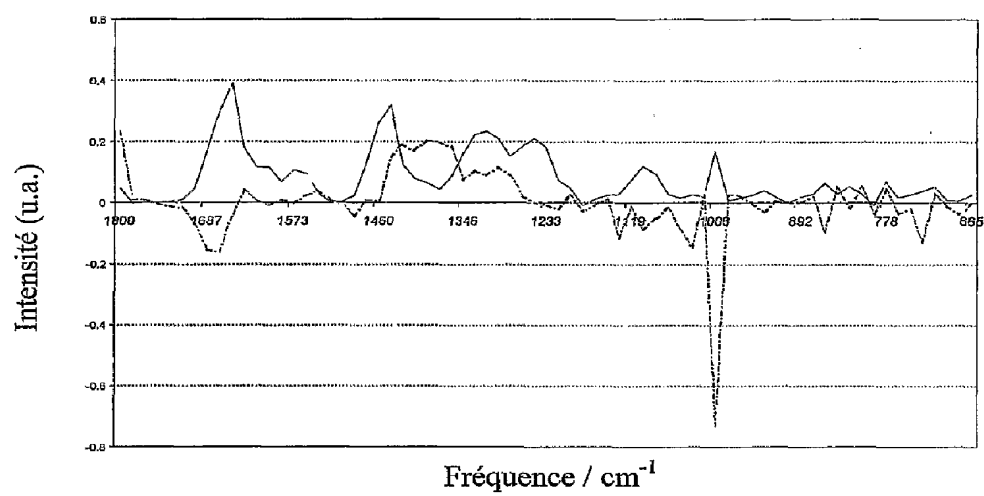
8) Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la caractéristique biologique fonctionnelle est la sensibilité  
10 ou la résistance à un ou plusieurs agents pharmacologiques.

Figure 1



2/5

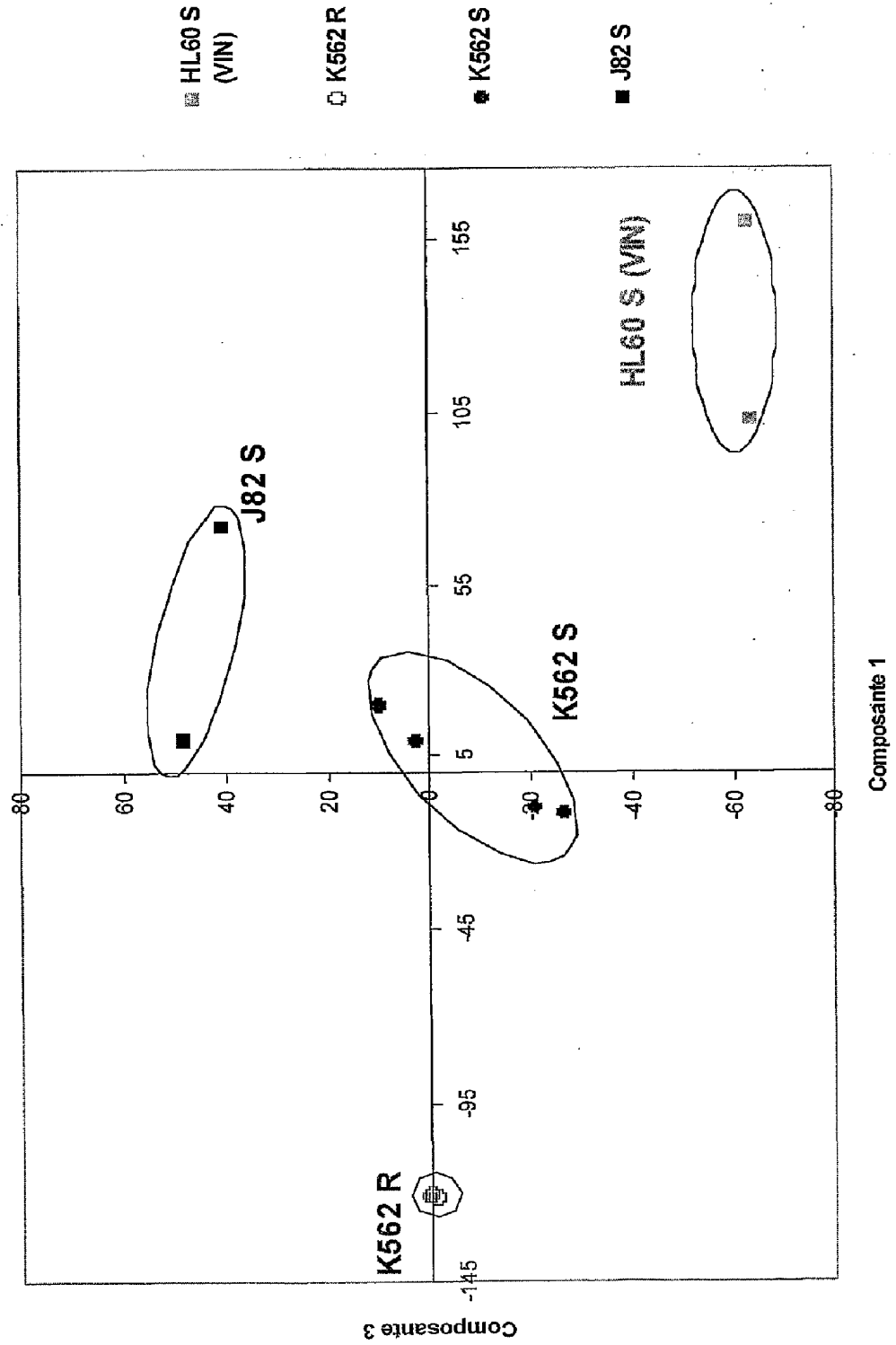
Figure 2





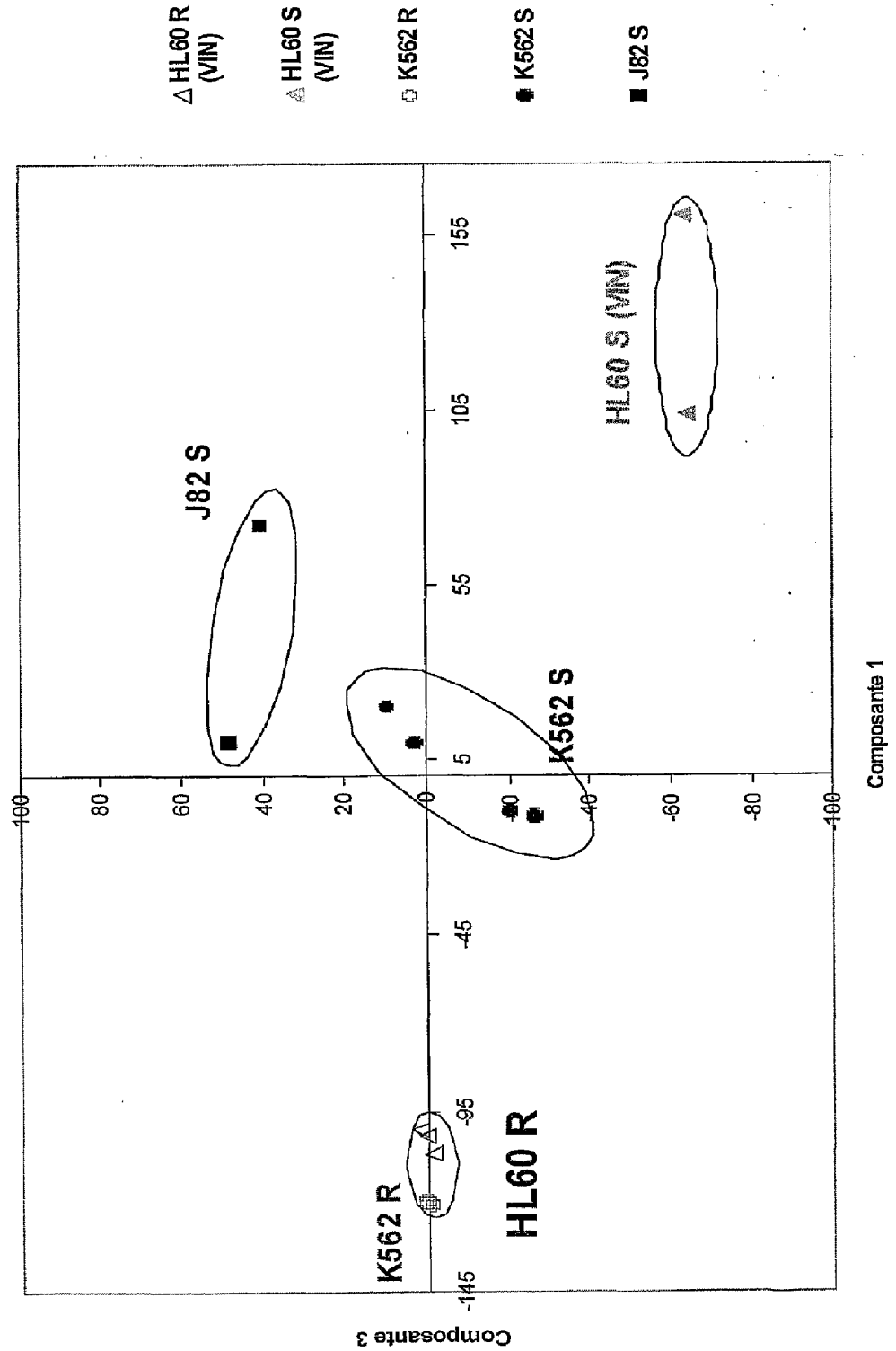
3/5

Figure 3



4/5

Figure 4



5/5

Figure 5

